ชื่อวิทยานิพนธ์	บทบาทของเอนไซม์ไตรเมทิลเอมีนออกไซด์ดีเมทิเลสจากปลาปากคมต่อการสูญเสียสภาพธรรมชาติของโปรตีนกล้ามเนื้อในระหว่างการเก็บรักษาในสภาวะแช่แข็งและแช่เย็น
ผู้เขียน	นางสาวกิตติมา ลีละพงศ์วัฒนา
สาขาวิชา	เทคโนโลยีอาหาร
ปีการศึกษา	2549

บทคัดย่อ

การศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางเคมี-กายภาพของปลาปากคมทั้งตัว เนื้อปลาแล่ และเนื้อปลาบดในระหว่างการเก็บรักษาภายใต้สภาวะการบรรจุแบบบรรยากาศปกติและสุญญากาศที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 สัปดาห์ พบว่าปริมาณฟอร์มัลดีไฮด์และไดเมทิลเอมีนเพิ่มขึ้นเมื่อระยะเวลาในการเก็บรักษาเพิ่มขึ้น ($P < 0.05$) ซึ่งมีความสัมพันธ์กับปริมาณของไตรเมทิลเอมีนออกไซด์ที่ลดลง ในขณะที่กิจกรรมของเอนไซม์ไตรเมทิลเอมีนออกไซม์ดีเมทิเลสเพิ่มขึ้นในช่วง 6 สัปดาห์แรกของการเก็บรักษาเนื้อปลาบด ส่วนปลาทั้งตัวและเนื้อปลาแล่มีกิจกรรมของเอนไซม์เพิ่มขึ้นอย่างเด่นชัดในช่วง 12 สัปดาห์แรก หลังจากนั้นกิจกรรมของเอนไซม์ลดลงอย่างต่อเนื่อง สำหรับเอนไซม์ Ca^{2+}-ATPase มีกิจกรรมลดลงตลอดระยะเวลาการเก็บรักษา โดยสัมพันธ์กับการลดลงของปริมาณโปรตีนที่ละลายได้ในสารละลายเกลือและการเพิ่มขึ้นของพันธะไดซัลไฟด์ซึ่งสอดคล้องกับการลดลงของหมู่ซัลฟ์ไฮดริล นอกจากนี้ไฮโดรโฟบิซิตี้บริเวณพื้นผิวของเนื้อปลาบดเพิ่มขึ้นสูงสุดในสัปดาห์ที่ 4 ของการเก็บการเก็บรักษา ในขณะที่ปลาทั้งตัวและเนื้อปลาแล่นั้นมีค่าเพิ่มขึ้นสูงสุดในสัปดาห์ที่ 12 หลังจากนั้นไฮโดรโฟบิซิตี้บริเวณพื้นผิวลดลงจนสิ้นสุดการเก็บรักษา โดยทั่วไป ตัวอย่างปลาปากคมที่เก็บรักษาภายใต้สภาวะสุญญากาศนั้นมีการเปลี่ยนแปลงทางเคมี-กายภาพสูงกว่าตัวอย่างที่เก็บรักษาภายใต้สภาวะบรรยากาศปกติ เมื่อเปรียบเทียบภายใต้สภาวะบรรยากาศเดียวกัน พบว่าเนื้อปลาบดมีค่าการเปลี่ยนแปลงสูงสุดเมื่อเปรียบเทียบกับปลาทั้งตัวและเนื้อปลาแล่ โดยปลาทั้งตัวมีการเปลี่ยนแปลงที่สูงกว่าเนื้อปลาแล่เล็กน้อย

โซเดียมซิเตรทและโซเดียมไพโรฟอสเฟตสามารถยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ไตรเมทิลเอมีนออกไซม์ดีเมทิเลสจากกล้ามเนื้อปลาปากคม โดยความสามารถในการยับยั้งขึ้นอยู่กับความเข้มข้นที่ใช้ นอกจากนี้ โซเดียมอัลจิเนตซึ่งเป็นไฮโดรคอลลอยด์สามารถยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ชนิดนี้ได้เช่นเดียวกัน การใช้โซเดียมไพโรฟอสเฟตในระดับความเข้มข้นร้อยละ 0.3 และโซเดียมอัลจิเนตในระดับความเข้มข้นร้อยละ 0.5 ร่วมกับสารป้องกันการสูญเสียสภาพธรรมชาติของโปรตีน (น้ำตาลซูโครส เข้มข้นร้อยละ 4 และ ซอร์บิทอล เข้มข้นร้อยละ 4) ในเนื้อปลาปากคมบดซึ่งเก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 สัปดาห์ พบว่าสามารถ

ป้องกันการเพิ่มขึ้นของกิจกรรมเอนไซม์ไตรเมทิลเอมีนออกไซม์ดีเมทิเลสในกล้ามเนื้อปลาปากคม ตลอดระยะเวลาการเก็บรักษา ซึ่งมีผลทำให้ปริมาณการสร้างฟอร์มัลดีไฮด์และไดเมทิลเอมีน ลดลงด้วยเช่นกัน เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม (ไม่เติมสารเติมแต่ง) นอกจากนี้ยังสามารถป้องกันการลดลงของการละลายของโปรตีนในระหว่างการเก็บรักษา ดังนั้นสารดังกล่าวมีบทบาทในการยับยั้งเอนไซม์ไตรเมทิลเอมีนออกไซม์ดีเมทิเลส รวมทั้งชะลอการสูญเสียสภาพธรรมชาติของโปรตีนซึ่งเหนี่ยวนำด้วยฟอร์มัลดีไฮด์

การเติมเอนไซม์ไตรเมทิลเอมีนออกไซม์ดีเมทิเลสจากไตของปลาปากคมที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์บางส่วน (ความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 1,276 เท่า) ในระบบที่มีโคแฟกเตอร์ซึ่งประกอบด้วยเฟอรัสคลอไรด์ แอสคอร์เบท และซีสเตอีน ในแอคโตไมโอซินธรรมชาติของปลาแฮดดอค พบว่าสามารถเร่งการผลิตฟอร์มัลดีไฮด์และไดเมทิลเอมีน ซึ่งมีความสัมพันธ์กับปริมาณของไตรเมทิลเอมีนออกไซด์ที่ลดลงเมื่อเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 วัน และที่อุณหภูมิ -10 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 8 สัปดาห์ โดยเฉพาะอย่างยิ่งในระบบที่มีเอนไซม์ในระดับความเข้มข้นที่สูงกว่า ฟอร์มัลดีไฮด์ที่เพิ่มขึ้นส่งผลให้ความสามารถในการละลายของโปรตีนในสารละลายโพแทสเซียมคลอไรด์เข้มข้น 0.6 โมลาร์ ลดลง นอกจากนี้ การเกิดออกซิเดชันของไขมันที่เพิ่มขึ้นในระหว่างการเก็บรักษานั้นมีความแตกต่างกันในแต่ละตัวอย่าง โดยในระบบที่ไม่มีการเติมเอนไซม์มีปริมาณเฮกซานาลที่สูงกว่า ภายหลังการเก็บรักษาแอคโตไมโอซินธรรมชาติที่อุณหภูมิ 4 และ -10 องศาเซลเซียส พบว่า มีการเปลี่ยนแปลงทางโครงสร้างของโปรตีนไมโอซินและแอคตินโดยการเหนี่ยวนำของฟอร์มัลดีไฮด์ ซึ่งบ่งชี้โดยการลดลงของอุณหภูมิ (T_m) และพลังงานที่ใช้ (ΔH) ในการทำให้โปรตีนไมโอซินและแอคตินสูญเสียสภาพธรรมชาติ ภายหลังจากการเก็บรักษาพบว่า ค่า final storage modulus (G') และ loss modulus (G'') ของแอคโตไมโอซินธรรมชาติของปลาแฮดดอค ซึ่งเก็บรักษาที่อุณหภูมิ -10 องศาเซลเซียส เพิ่มขึ้นสูงกว่าตัวอย่างซึ่งเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นอกจากนี้ ความเข้มข้นของเอนไซม์ไตรเมทิลเอมีนออกไซม์ดีเมทิเลสและอุณหภูมิในการเก็บรักษามีผลต่อการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างทุติยภูมิของโปรตีนและการเกิดอันตรกิริยาไฮโดรโฟบิกของหมู่อะลิฟาติค ซึ่งบ่งชี้โดยการลดลงของหมู่เอไมด์ (amide I และ amide III) และ CH_2 bending (1450 cm^{-1}) ส่วนการเปลี่ยนแปลงของ doublet (830 และ 850 cm^{-1}) นั้นแสดงถึงความเกี่ยวข้องของหมู่ไทโรซีนในการเป็นตัวให้สำหรับการเกิดพันธะไฮโดรเจน โดยทั่วไปแอคโตไมโอซินธรรมชาติของปลาแฮดดอคที่มีเอนไซม์ไตรเมทิลเอมีนออกไซม์ดีเมทิเลสและเก็บรักษาที่อุณหภูมิ -10 องศาเซลเซียส มีการเปลี่ยนแปลงทางโครงสร้างโปรตีนมากกว่าตัวอย่างที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส โดยเฉพาะอย่างยิ่งในระบบที่มีเอนไซม์ในระดับความเข้มข้น 15 ยูนิตต่อกรัมของตัวอย่าง

การเติมสารยับยั้งเอนไซม์ไตรเมทิลเอมีนออกไซม์ดีเมทิเลส (โซเดียมไพโรฟอสเฟต เข้มข้นร้อยละ 0.3 และ โซเดียมอัลจิเนต เข้มข้นร้อยละ 0.5) ร่วมกับสารต้านการเกิด

ออกซิเดชัน (กรดแอสคอร์บิค เข้มข้น 250 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม และ โทโคฟีรอล เข้มข้น 250 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม) ในเนื้อปลาแฮดดอคบดซึ่งมีการเติมเอนไซม์ไตรเมทิลเอมีนออกไซม์ดีเมทิเลสจากไตของปลาปากคมที่ระดับความเข้มข้น 15 ยูนิตต่อกรัม พบว่าสารยับยั้งเอนไซม์ไตรเมทิลเอมีนออกไซม์ดีเมทิเลสสามารถลดการสร้างฟอร์มัลดีไฮด์ซึ่งเป็นผลจากกิจกรรมของเอนไซม์ไตรเมทิลเอมีนออกไซม์ดีเมทิเลส ตลอดระยะเวลาของการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ –10 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 สัปดาห์ ในขณะที่การเติมสารต้านการเกิดออกซิเดชันมีผลเหนี่ยวนำให้เกิดการสร้างฟอร์มัลดีไฮด์ในปริมาณที่เพิ่มสูงขึ้น การสร้างไดเมทิลเอมีนในเนื้อปลาบดที่มีการเติมเอนไซม์นั้นมีความสัมพันธ์กับการลดลงของไตรเมทิลเอมีนออกไซด์ อย่างไรก็ตาม การเติมสารต้านการเกิดออกซิเดชันนั้นมีผลในการยับยั้งการเกิดออกซิเดชันของไขมันในเนื้อปลาบด การเติมสารยับยั้งเอนไซม์ไตรเมทิลเอมีนออกไซม์ดีเมทิเลสมีผลลดค่า G' และ G'' ของเนื้อปลาบดซึ่งประกอบด้วยเอนไซม์ดังกล่าว ส่วนสารต้านการเกิดออกซิเดชันมีผลเพิ่มค่า G' และ G'' การเติมสารยับยั้งเอนไซม์ไตรเมทิลเอมีนออกไซม์ดีเมทิเลสร่วมกับสารต้านการเกิดออกซิเดชันที่เหมาะสม น่าจะมีผลลดการสูญเสียสภาพธรรมชาติของโปรตีนกล้ามเนื้อ ซึ่งเหนี่ยวนำโดยฟอร์มัลดีไฮด์และปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมันระหว่างการเก็บรักษาในสภาพแช่แข็ง

Thesis Title	The Role of Lizardfish Trimethylamine-*N*-oxide Demethylase in the Aggregation of Muscle Proteins during Frozen and Chilled Storage
Author	Miss Kittima Leelapongwattana
Major Program	Food Technology
Academic Year	2006

ABSTRACT

Physicochemical and biochemical changes of whole lizardfish (*Saurida tumbil*), its fillets and minced flesh kept in air and under vacuum during frozen storage at -20°C for 24 weeks were investigated. Formaldehyde (FA) and dimethylamine (DMA) contents increased with a concomitant decrease in trimethylamine oxide (TMAO) content as the storage time increased ($P < 0.05$). A marked increase in trimethylamine-*N*-oxide demethylase (TMAOase) activities was observed up to 6 weeks in minced flesh and up to 12 weeks in whole fish and its fillets. Thereafter, the continuous decreases were observed until the end of storage. Ca^{2+}-ATPase activity decreased continuously with a coincidental decrease in the salt-soluble fraction. Disulfide bond formation was found with the coincidental decrease in sulfhydryl content during extended storage ($P < 0.05$). Surface hydrophobicity of minced flesh increased up to 4 weeks, whereas whole fish and its fillets had the continuous increase in surface hydrophobibity up to 12 weeks. Subsequently, surface hydrophobicity of all samples decreased until the end of storage ($P < 0.05$). In general, the greater changes were observed in the samples kept under vacuum than those kept in air. With the same atmosphere used, minced flesh showed the greatest changes, compared with that found in whole fish and its fillets. The whole fish showed slightly higher changes than the fillets.

Sodium citrate and pyrophosphate could inhibit the activity of TMAOase from lizardfish (*Saurida tumbil*) muscle in a concentration dependent manner, most likely due to their chelating property. Sodium alginate was the hydrocolloid possessing the inhibitory activity towards TMAOase ($P < 0.05$). During the storage of lizardfish mince at -20°C for 24 weeks, the addition of 0.5% sodium alginate and 0.3% pyrophosphate in combination with cryoprotectants (4% sucrose and 4% sorbitol) retarded an increase in TMAOase activities with the coincidental lowered formation of DMA and FA, compared

with the control (without additives) ($P < 0.05$). The loss in solubility of muscle proteins was also impeded with the addition of those compounds, suggesting their role in the inhibition of TMAOase as well as the retardation of protein denaturation induced by FA.

The addition of TMAOase, which was partially purified from lizardfish (*Saurida tumbil*) kidney to 1276-fold, to haddock natural actomyosin (NAM) in the presence of cofactors ($FeCl_2$, ascorbate, and cysteine) resulted in the acceleration of FA formation throughout the storage either at 4°C for 15 days or at -10°C for 8 weeks ($P < 0.05$). The formation of DMA was also enhanced with a concomitant decrease in TMAO content with the addition of TMAOase, particularly at higher concentration. The loss of protein solubility in 0.6 M KCl increased as the result of FA formation during prolonged storage. Lipid oxidation during extended storage occurred to different degrees. Simulated NAM systems without TMAOase generally contained the higher hexanal content ($P < 0.05$). Differential scanning calorimetry (DSC) of NAM after storage at 4 and -10°C showed the lower maximum transition temperatures (T_m) and enthalpy of endothermic peaks (ΔH) corresponding to myosin and actin, suggesting the conformational changes of NAM induced by FA formed. The greater increases in final storage modulus (G') and loss modulus (G'') were observed in the simulated NAM systems stored at -10°C, compared to those stored at 4°C ($P < 0.05$). The structure of haddock NAM was also altered as a function of storage temperature and TMAOase concentration as evidenced by the decrease in amide I, amide III bands and CH_2 bending region near 1450 cm^{-1}. The results suggested the changes in protein secondary structures and an increase in hydrophobic interactions of aliphatic residues. Changes in a doublet near 830 and 850 cm^{-1} indicated an involvement of tyrosine residues as hydrogen bond donors in the system containing TMAOase after storage at both temperatures. The systems stored at -10°C generally showed greater structural alteration than those kept at 4°C, especially in the presence of 15 units of TMAOase/g.

The addition of TMAOase inhibitors (0.3% sodium pyrophosphate and 0.5% sodium alginate) in haddock mince containing 15 units of TMAOase/g retarded the FA formation throughout the storage at -10°C for 6 weeks ($P < 0.05$). However, antioxidants (250 mg tocopherol/kg and 250 mg ascorbic acid/kg mince) induced the formation of FA. DMA was formed in the mince added with TMAOase with a concomitant decrease in TMAO content. Antioxidants impeded lipid oxidation. TMAOase inhibitors

lowered G' and G'' of mince containing TMAOase, whereas antioxidants resulted in the increases in G' and G''. The addition of TMAOase inhibitors together with appropriate antioxidant most likely decrease the protein denaturation of muscle proteins induced by both FA and lipid oxidation during frozen storage.